

УДК 615: 537.635

UDC 615: 537.635

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАВ В РАСТЕНИЯХ –
ПРОДУЦЕНТАХ В КУЛЬТУРЕ INVITRO И
IN SITU**

**APPLICATION OF SPECTROSCOPY IN
NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TO
DETERMINE THE BAS IN PRODUCER PLANTS
IN CULTURE OF IN VITRO AND IN SITU**

Филенко Юлия Александровна
к.э.н, научный сотрудник

Filenko Yulia Alexandrovna
Cand.Econ.Sci., research associate

Богданова Екатерина Алексеевна
студент

Bogdanova Ekaterina Alekseevna
student

Ласточкин Денис Михайлович
к.т.н., доцент

Lastochkin Denis Mihajlovich
Cand.Tech.Sci., associate professor

Андреева Ирина Владимировна
студент

Andreeva Irina Vladimirovna
student

Дождикова Ольга Александровна
студент

Dozhdikova Olga Aleksandrovna
student

Озерова Вероника Васильевна
студент

Ozerova Veronika Vasilyevna
student

Томурова Юлия Владимировна
студент

Tomurova Julija Vladimirovna
student

Новикова Анна Александровна
студент
*Поволжский государственный технологический
университет, Йошкар-Ола, Россия*

Novikova Anna Aleksandrovna
student
*Volga State University of Technology,
Yoshkar-Ola, Russia*

В статье рассматривается применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса для определения биологически активных веществ в растениях – продуцентах в культуре in vitro и in situ. Так же говорится о преимуществах получения БАВ из растений в культуре in vitro. Сформулировано ряд задач для теоретического обоснования и экспериментальных разработок основных принципов применения спектроскопии ядерного магнитного резонанса в фармацевтическом анализе для стандартизации и оценки качества БАВ

This article discusses the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the determination of biologically active substances-producing plants in the culture of in vitro and in situ. The same is said about the benefits of obtaining biologically active substances from plants in culture in vitro. Formulated a number of problems for theoretical study and experimental development basic principles on the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmaceutical analysis for standardization and quality assessment of BAS

Ключевые слова: БАВ, ЯМР, КУЛЬТУРА IN VITRO И IN SITU, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ОЦЕНКА КАЧЕСТВА

Keywords: BAS, NMR, CULTURE OF IN VITRO AND IN SITU, PHARMACEUTICAL ANALYSIS, EVALUATION OF QUALITY

Растения являются единственными в природе организмами, способными синтезировать из неорганических веществ органические, необходимые для жизнедеятельности человека и животных. Другие живые организмы этим свойством не обладают. Следовательно, растение

представляет собой сложную лабораторию, в которой из углекислого газа, воды и неорганических веществ синтезируется огромное количество различных соединений.

Целью дальнейших исследований является теоретическое обоснование и экспериментальная разработка основных принципов применения спектроскопии ядерного магнитного резонанса в фармацевтическом анализе для стандартизации и оценки качества БАВ.

Для достижения выше поставленной цели исследования необходимо будет решить следующие задачи:

1. Изучить основные направления развития, выявить и обосновать приоритетные области применения спектроскопии ядерного магнитного резонанса в анализе БАВ;

2. Получить спектры ЯМР наиболее распространенных БАВ в одинаковых условиях;

3. Провести и уточнить отнесение ряда сигналов в спектрах ЯМР изучаемых БАВ;

4. Сопоставить спектры ЯМР БАВ, близких по строению, для установления характера влияния на спектр различных заместителей;

5. Выявить наиболее важные аналитические сигналы в спектрах ЯМР, которые могут быть использованы для идентификации изучаемых БАВ;

6. Разработать унифицированные методики идентификации БАВ методом спектроскопии ЯМР;

7. Разработать методики определения компонентного состава БАВ, их примесей;

8. Получить сравнительные данные спектров ЯМР стандартных БАВ, выявить степень их соответствия;

9. Создать специализированную базу данных спектров ЯМР для целей стандартизации и оценки качества БАВ.

В лекарственном сырье наряду с действующими веществами содержатся и так называемые сопутствующие вещества, которые также могут обладать фармакологической активностью. Довольно часто сопутствующие вещества влияют на действие БАВ, потенцируя или ингибируя их фармакологический эффект. Качественный состав БАВ может быть различным в разных органах у одного и того же растения, это зависит от сроков заготовки лекарственного растительного сырья. Биологически активные вещества неравномерно распределяются по органам и тканям растений с преимущественной локализацией в определенных органах. На образование и накопление БАВ влияет и возраст растений. Это обязательно учитывают при культивировании растений [1].

Одним из важных показателей качества лекарственного растительного сырья является содержание основных биологически активных веществ. Их определение проводится с помощью химических и физико-химических методов анализа, основанных на физических, химических и биологических свойствах БАВ [2].

Известно, что на химический состав растений влияет ряд факторов:

1. Географический (т.е. в растениях южных широт накапливается больше эфирного масла и алкалоидов, в умеренной зоне – больше флавоноидов, дубильных веществ, в растениях северных широт – больше аскорбиновой кислоты, жирных масел и т.д.).

2. Климатический (тепло, свет, влажность). Количество тепловой, световой энергии, осадков и влажность окружающей среды оказывают существенное влияние на химический состав лекарственных растений, на накопление различных групп БАВ.

3. Эдафический (почвенный). На химический состав лекарственных растений оказывает влияние плодородие, механическая

структура, влажность, рН почвы, ее химический состав, содержание в ней минеральных веществ.

4. Орографический (рельеф). На химический состав лекарственных растений влияет высота над уровнем моря, экспозиция, крутизна склонов (например, Женьшень лучше растет и накапливает БАВ на восточных и западных склонах в кедрово-широколиственных лесах до высоты 700 м над уровнем моря.

5. Биотический. Окружающая живая природа также оказывает влияние на химический состав лекарственных растений, и прежде всего сказывается влияние растительного сообщества (фитоценоза) – фитоценотический фактор [3,4].

В настоящее время известно около 15 тыс. веществ – загрязнителей окружающей среды (атмосферы, воды, почвы). Наиболее опасны из них по токсикологическим признакам:

- полициклические ароматические углеводороды (бенз(а)пирен); металлы – стронций (Sr), хром (Cr), селен (Se), магний (Mg), алюминий (Al), никель (Ni), кадмий (Cd), свинец (Pb), медь (Cu), цинк (Zn), железо (Fe), марганец (Mn) и др.;

- нитраты – калиевая, натриевая, кальциевая, аммиачная селитры, мочевины, аммофос, нитроаммофоска и др.;

- гербициды, пестициды – прометрин, трифлурамин, 4,6-динитро-ортокерзол (ДНОК) и др.;

- радионуклиды – стронций-90, цезий-137 и др. [5,6].

Таким образом, совокупность влияния онтогенетических факторов и факторов окружающей среды определяет химический состав лекарственных растений и его изменчивость, а соответственно и влияет на количественный и качественный состав БАВ в растениях.

Традиционно биологически активные вещества растений получают на основе использования природного сырья. Зачастую

используют биомассу дикорастущих лекарственных растений, часть получают с полей специализированных хозяйств, где растения культивируют, повышают урожайность различными мероприятиями и собирают механическим способом. Широкое использование растений, для получения биологически активных веществ, привело к стремительному сокращению их в природе. Некоторые из них относятся к редким и исчезающим видам, многие растения долго восстанавливают свои площади произрастания.

Поэтому для получения и сохранения растений - источника биологически активных веществ, кроме традиционных методов, таких как интродукция, организация заповедников, заказников, создание плантаций, существуют иные методы. Одним из них является культура клеток и тканей высших растений *in vitro*.

Культура клеток и тканей высших растений является нетрадиционным методом охраны лекарственных растений, сохранения ценного генофонда древесных и травянистых растительных форм, методом получения, оздоровления, возобновления и размножения растений за счёт круглогодичного продуцирования регенерантов и массового выхода посадочного материала путём клонального микроразмножения [7,8,9]. Увеличения номенклатуры лекарственных растений, полученных методом культивирования *invitro*, используемых для производства БАДов, для использования в лечебно-профилактических и гомеопатических лекарственных средствах, в виде моносырья обусловлено рядом причин, а именно, увеличение доли препаратов растительного происхождения в общем объёме производства лекарственных средств во многих странах мира; увеличение числа фитопредприятий, а также специализированных производств, занимающихся выпуском БАДов на основе лекарственного растительного сырья; увеличение доли лекарственного растительного

сырья, экспортируемого за рубеж, в связи с резко сократившимися во многих странах мира объёмами заготовок отечественного сырья[10].

Так как растения *in situ*, произрастая в неблагоприятных экологических условиях, накапливают несвойственные им химические вещества либо вещества в несвойственных растениям концентрациях. Загрязненное лекарственное растительное сырье и фитопрепараты, полученные из такого сырья, являются одним из источников поступления ксенобиотиков в организм человека. Они вызывают серьезные нарушения работы различных органов и систем организма, многие из них меняют в организме человека фармакологическую активность лекарственных веществ.

К основным антропогенным факторам, оказывающим наиболее существенное негативное влияние на дикорастущие лекарственные растения, относятся:

- загрязнение окружающей среды промышленными предприятиями;
- загрязнение окружающей среды автомобильным транспортом;
- использование в сельском и лесном хозяйстве пестицидов, прежде всего средств борьбы с животными-вредителями (грызунами), насекомыми (родентицидов, инсектицидов); средств борьбы с сорняками (гербицидов), болезнями растений (нематоцидов, фунгицидов); азотных удобрений и других химикатов;
- загрязнение окружающей среды в результате техногенных катастроф (аварии на атомных электростанциях, разрывы магистральных трубопроводов и т. д.)[11].

Наибольшее накопление веществ-загрязнителей происходит в растениях с крупными листьями, с листьями в прикорневой розетке, с опущенными листьями, образующих густые заросли.

Экологически чистое лекарственное растительное сырье, полученное путем культивирования *in vitro*, может использоваться не только для

лечения различных заболеваний, а так же и в борьбе с последствиями экологических бедствий. Установлено, что основная часть токсинов при экологическом загрязнении переходит из крови в межклеточное, а затем и внутриклеточное пространство органов и тканей человека. Если вызываемые ими изменения не приняли еще необратимого характера, могут помочь некоторые лекарственные растения, обладающие эндоэкологическим действием. Они способствуют вымыванию токсинов из межклеточного, а некоторые и из внутриклеточного пространства.

Для установления структуры биологически активных веществ и изучения механизмов их действия было предложено использование применения ЯМР. Важной особенностью метода, особенно для биологии и медицины, является низкая энергия используемых в ЯМР излучений, что существенно снижает их вредное воздействие на организм.

Применение ЯМР для структурных исследований основано на том, что помимо внешнего магнитного поля на ядро в веществе действуют различные внутренние поля. Они приводят к сдвигу частоты резонанса, расщеплению на несколько или множество резонансных линий, т.е. к образованию спектра ЯМР, к изменению формы линий, времени релаксации. Изучение спектров ЯМР позволяет сделать вывод о химической и пространственной структуре различных веществ без проведения химического анализа. ЯМР является одним из наиболее эффективных аналитических методов [12].

С помощью ЯМР можно получить информацию:

- о подвижности ядер водорода и ее распределении в образце;
- о соотношении твердой и жидкой фракций в образцах;
- о скорости диффузии и самодиффузии;
- о протонной плотности образца;
- о спектральном распределении химически эквивалентных и неэквивалентных протонов[13].

Эффективность метода ЯМР обусловлена, в частности, тем обстоятельством, что для получения аналитического сигнала от органических веществ достаточно наличия в молекулах веществ атомов водорода (спектроскопия ^1H ЯМР) или углерода (спектроскопия ^{13}C). В спектрах ЯМР проявляются атомы водорода или углерода всех веществ, находящихся в анализируемой пробе образца. При этом нормированная под сигналом площадь (площадь, приведенная к одной молекуле, протонная единица) не зависит от того, в каком фрагменте молекулы или в какой молекуле находятся анализируемые атомы водорода или углерода, а также от концентрации веществ. Этим метод ЯМР выгодно отличается от других физических методов. Отношение нормированных площадей сигналов разных молекул равно отношению количества молекул этих веществ в анализируемом образце. Это свойство аналитического сигнала ЯМР весьма ценно для количественных измерений. ЯМР спектры экстрактов представляют суперпозицию спектров отдельных веществ, составляющих БАВ в соответствующих весовых соотношениях. Корреляция полученных ЯМР характеристик с химическим составом БАВ и литературными данными позволяет сделать вывод об эффективности ЯМР-спектроскопии в изучении химического состава и стандартизации БАВ и веществ, входящих в его состав [14].

Методика использования ЯМР спектроскопии позволяет не инвазивно в режиме реального времени отслеживать концентрации всех промежуточных продуктов обмена веществ в среде для культивирования. Данные, полученные этим методом, могут быть использованы для изучения процессов роста различных микроорганизмов.

В заключении можно отметить основные достоинства метода ЯМР:

- высокая разрешающая способность – на десять порядков больше, чем у оптической спектроскопии;

- возможность вести количественный учет (подсчет) резонирующих ядер.(это открывает возможности для количественного анализа вещества);
- спектры ЯМР зависят от характера процессов, протекающих в растениях;
- современная радиоэлектронная аппаратура и ЭВМ позволяют получать параметры, характеризующие явление, в удобной для исследователей и потребителей метода ЯМР форме (данное обстоятельство особенно важно, когда речь идет о практическом использовании экспериментальных данных);
- высокая специфичность и оперативность метода ЯМР, отсутствие химического воздействия на растение, возможность непрерывного измерения параметров открывают многообразные пути его применения в биотехнологии [15].

Внедрению метода ЯМР препятствовали лишь сложность аппаратуры и ее эксплуатации, высокая стоимость спектрометров, исследовательский характер самого метода.

Последние революционизирующие изобретения в области ЯМР, включая удивительные методы получения ЯМР-изображений, убедительно свидетельствуют о том, что границы возможного в ЯМР действительно безграничны. Замечательные преимущества ЯМР, которые будут высоко оценены человечеством и которые сейчас являются мощным стимулом стремительного развития ЯМР и широкого применения в биотехнологии и медицине, заключаются в очень малой вредности для изучения лечебных свойств растений.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 14.В37.21.1110 от 14 сентября 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

Список литературы

1. Бочарова О.А. / Вести РАМН. 2002. № 5. С. 49 – 53.

2. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Мезенцева М.Н. и др. / Бюллетень экспериментальной биологии. 2003. Т. 136. № 12. С. 670 – 673.
3. Государственная Фармакопея (XI издание). Т. 2. – М.: Медицина, 1989. С. 226 – 380.
4. Протасова Н.А. Микроэлементы: биологическая роль, распределение в почвах, влияние на распространение заболеваний человека и животных // Соросовский Образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – № 3. – С. 25-32.
5. Зенкевич И.Г., Багирова В.Л., Сокольская Т.А., Нечаева Е.Б. / Фармация. 2002. № 1. С. 43.
6. Stanway A. Trace elements. – London: Van Dyke Books, 1983. – 80 p.
7. Яковлева Г.П., К.Ф. Блиновой Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия СПб.: СпецЛит, 2004.- 289 с.
8. Сергеев Р.В. Размножение *in vitro* генотипов ивы с повышенным содержанием биологически активных веществ для плантационного выращивания на салицин / Р.В. Сергеев, А.И. Шургин // Лесной журнал. № 6. – 2009. – С. 40-45.
9. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных клеток и тканей в решении задач физиологии растений // Новые направления в физиологии растений. М.: Наука, 1985.- С. 270.
10. Сергеев Р.В. Изучение влияния минерального и гормонального состава среды на размножение *in vitro* генотипов ивы с повышенным содержанием биологически активных веществ / Р.В. Сергеев, А.И. Шургин // Вестник МарГТУ. № 2(9). – 2010. – С. 93-100.
11. Шилова И.В., Сырчина А.И., Краснов Е.А., Семенов А.А., Суслов Н.И. Химико- фармакологическое исследование активной фракции *Atragesibirica* L.// Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: Матер. Междунар.конф. (27–29 июня 2000 г.). Томск, 2000. С. 72.
12. Nuclear Magnetic Resonance / ed. by H. F. Linskens and J. F. Jackson, Modern Methods of Plant Analysis, New Series. – Berlin: Springer, 1986. V. 2. – 196 p.
13. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР / пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 478 с.
14. Сильверстейн Р., Вебетер Ф., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 520 с.
15. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии – М.: БИНОМ. Лабораториязнаний, 2003. – 493 с.

References

1. Bocharova O.A. / Vesti RAMN. 2002. № 5. S. 49 – 53.
2. Bocharova O.A., Lyzhenkova M.A., Mezenceva M.N. i dr. / Bjulleten' jeksperimental'noj biologii. 2003. T. 136. № 12. S. 670 – 673.
3. Gosudarstvennaja Farmakopeja (XI izdanie). T. 2. – M.: Medicina, 1989. S. 226 – 380.
4. Protasova N.A. Mikrojelementy: biologicheskaja rol', raspredelenie v pochvah, vlijanie na rasprostranenie zabolevanij cheloveka i zhivotnyh // Sorosovskij Obrazovatel'nyj zhurnal. – 2001. – T. 7. – № 3. – S. 25-32.
5. Zenkevich I.G., Bagirova V.L., Sokol'skaja T.A., Nechaeva E.B. / Farmacija. 2002. № 1. S. 43.
6. Stanway A. Trace elements. – London: Van Dyke Books, 1983. – 80 p.

7. Jakovleva G.P., K.F. Blinovoj Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. Farmakognozija SPb.: SpecLit, 2004.- 289 s.
8. Sergeev R.V. Razmnozhenie invitro genotipov ivy s povyshennym sodержaniem biologicheski aktivnyh veshhestv dlja plantacionnogo vyrashhivaniya na salicin / R.V. Sergeev, A.I. Shurgin // Lesnoj zhurnal. № 6. – 2009. – S. 40-45.
9. Butenko, R.G. Kul'tura izolirovannyh kletok i tkanej v reshenii zadach fiziologii rastenij // Novye napravlenija v fiziologii rastenij. M.: Nauka, 1985.- S. 270.
10. Sergeev R.V. Izuchenie vlijaniya mineral'nogo i gormonal'nogo sostava sredy na razmnozhenie invitro genotipov ivy s povyshennym sodержaniem biologicheski aktivnyh veshhestv / R.V. Sergeev, A.I. Shurgin // Vestnik MarGTU. № 2(9). – 2010. – S. 93-100.
11. Shilova I.V., Sychina A.I., Krasnov E.A., Semenov A.A., Suslov N.I. Himiko-farmakologicheskoe issledovanie aktivnoj frakcii Atragesibirica L.// Poisk, razrabotka i vnedrenie novyh lekarstvennyh sredstv i organizacionnyh form farmacevticheskoj dejatel'nosti: Mater. Mezhdunar.konf. (27–29 ijunja 2000 g.). Tomsk, 2000. С. 72.
12. Nuclear Magnetic Resonance / ed. by H. F. Linskens and J. F. Jackson, Modern Methods of Plant Analysis, New Series. – Berlin: Springer, 1986. V. 2. – 196 p.
13. Gjunter H. Vvedenie v kurs spektroskopii JaMR / per. s angl. – M.: Mir, 1984. – 478 s.
14. Sil'verstejn R., Vebeter F., Kiml D. Spektrometricheskaja identifikacija organicheskikh soedinenij – M.: BINOM. Laboratorija znaniy, 2011. – 520 s.
15. Lebedev A. T. Mass-spektrometrija v organicheskoi himii – M.: BINOM. Laboratorijaznaniy, 2003. – 493 s.